DOI:10.11931/guihaia.gxzw201805058

甘薯 *IbGL3* 的克隆和表达分析

徐靖[1]，朱红林[1]，朱家红[2]， 符策强[1]，韩义胜[1]，

唐力琼[1]，王敏芬，王新华[1]，王效宁[1*]

(1.海南省农业科学院粮食作物研究所，海南省农作物遗传育种重点实验室，农业部作物基因资源与种质创制海南科学观测实验站，海口 571100; 2.中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所，海口 571101)

摘要：紫肉甘薯富含花青素，具有较高的食用和药用价值。花青素的生物合成受到结构基因和调节基因的控制。bHLH（basic helix-loop-helix protein）转录因子能够调节多个花青素结构基因基因的表达，在花青素生物合成途径中具有重要的调控作用，但目前在甘薯中还没有关于bHLH调控花青素生物合成的相关报道。本研究根据甘薯转录组数据，利用RT-PCR技术在甘薯中克隆了一个2 120 bp的*bHLH*基因*IbGL3*，该基因包含一个1 878 bp的开放阅读框，编码625个氨基酸，蛋白质分子量69.08 k D，理论等电点(pI)5.20。IbGL3蛋白和其他植物中类黄酮合成相关的bHLH蛋白具有较高的同源性，都包含保守的MIR区、bHLH结构域和ACT类似结构域。系统发育进化树分析结果显示，IbGL3与其他植物类黄酮相关bHLH蛋白聚为一类，属于IIIf 亚类成员。表达结果显示，*IbGL3*基因在深紫色甘薯中的表达量最高，在浅紫色甘薯中的表达量次之，而在白肉甘薯中表达量最低，与花青素积累正相关，推测其在甘薯花青素生物合成途径中具有重要的调控作用。该研究结果有助于进一步了解*IbGL3*在甘薯花青素生物合成的功能和作用机理，为甘薯花青素生物合成遗传改良奠定基础。

关键词：甘薯，花青素，bHLH转录因子，基因表达

中图分类号：Q943.2　　　　文献标识码：A

Cloning and expression analysis of *IbGL3* in *Ipomoea batatas*

XU Jing[1], ZHU Honglin[1], ZHU Jiahong[2], FU Ceqiang[1], HAN Yisheng[1], TANG Liqiong[1], WANG Minfen[1], WANG Xinhua[1], WANG Xiaoning[1*]

基金项目：海南省科研院所技术开发专项(KYYS-2018-03)[Supported by Hainan provincial research institutes is specialized in technology development (KYYS-2018-03)]。

作者简介：徐靖(1981-)，女，安徽淮北人，硕士，副研究员，主要从事甘薯种质资源创新利用研究，(E-mail) jing_jing_xu@163.com。

通讯作者：王效宁，硕士，研究员，主要从事作物种质资源创新利用研究，(E-mail) wxning2599@163.com。

(1. *Institute of Cereal Crops, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hainan Province, Scientific Observation Station for Gene Resources and Germplasm Creation of Hainan, Ministry of Agriculture,* Haikou 571100, China; 2. *Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, Haikou 571101, China)

Abstract: Anthocyanin-rich purple sweet potatos have high edible and medicinal value. Anthocyanin biosynthesis is controlled by structural genes and regulatory genes. The bHLH (basic helix-loop-helix protein) transcription factor plays an important role in anthocyanin biosynthesis by regulating multiple structural genes. However, there are no reports about bHLH regulating anthocyanin biosynthesis in sweet potato. In this study, a *bHLH* gene named *IbGL3* was cloned in *Ipomoea batatas* based on transcriptome data and RT-PCR technology. The full-length cDNA of *IbGL3* was 2 120 bp, containing 1 878 bp opening reading frame (ORF), and encoding 625 amino acids. The encoded protein of *IbGL3* has a molecular weight of 69.08 kD and the theoretical isoelectric point (pI) of 5.20. The IbGL3 protein was classified as unstable protein instability with index of instability index 43.06, and belonged to hydrophilic protein with grand average of hydropathicity of -0.555. Subcellular localization prediction showed that IbGL3 was most likely to be located in the nucleus, and the nuclear localization signal (PSSKKRKASKT) was located at the C-terminal. Signal peptide analysis showed that IbGL3 protein had no signal peptide and was not a secretory protein. Transmembrane domain analysis showed that IbGL3 protein had no transmembrane domain. The IbGL3 protein had highly conserved MIR motif, bHLH domain and ACT domain, shared high identities and similar domains with bHLH proteins involved in anthocyanin biosynthesis from other plants. Phylogenetic analysis showed that and IbGL3 was clustered in the IIIf bHLH subgroup together with other anthocyanin-related bHLH proteins. The expression of *IbGL3* in the storage root of different sweet potato varieties was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results indicated that *IbGL3* was mainly expressed in purple-fleshed sweet potato, followed by light purple-fleshed sweet potato and weakly expressed in white-fleshed sweet potato, and its expression was positively related to the accumulation of anthocyanin *Ipomoea batatas*. The results showed *IbGL3* may be involved in regulating anthocyanin biosynthesis in *Ipomoea batatas.* The results will provide assistance and guidance to further understand the function and molecular mechanism of *IbGL3* in the biosynthesis of anthocyanins in sweet potato, and lay the foundation for genetic improvement of

anthocyanin in sweet potato.

Key word: *Ipomoea batatas*, anthocyanin, bHLH transcription factor, gene expression

花青素是一种存在于植物体内的类黄酮化合物，不仅在植物的花着色、抵御紫外线伤害、防止病源微生物侵袭等过程中起决定作用，还具有重要的营养价值和医疗保健功效 (Panche et al, 2016; Lila, 2008)。花青素生物合成途径在模式植物中已得到广泛研究，相关基因已在多种植物中得到分离(Hichri et al, 2011; Albert et al, 2014; Wang et al, 2015)。植物类花青素生物合成主要受两类基因控制：一类是结构基因，编码与类黄酮生物合成有关的各种酶类；另一类是调节基因，其编码的转录因子通过调控多个结构基因的表达参与对类黄酮次生代谢的调控(Hichri et al, 2011; Wang et al, 2015)。研究证实，花青素的生物合成主要受到转录因子MYB、bHLH和WD40组成的MYB-bHLH-WD40(MBW)转录复合体的调控(Xu et al, 2015)。bHLH 转录因子是一类含有basichelix-loop-helix (bHLH) 结构域的转录因子，根据结构特征可分为12个亚类(Ⅰ-Ⅻ)，而调控类黄酮生物合成的bHLH蛋白主要集中在Ⅲf 亚类 (Xu et al, 2015; Heim et al, 2003)。拟南芥中与调控花青素生物相关的bHLH转录因子主要有TT8/AtbHLH42、GL3/AtbHLH1和EGL3/ AtbHLH2（Gonzalez et al, 2008）。首个调控花青素生物合成的*bHLH*基因在玉米中得到分离和鉴定(Chandler et al, 1989)。目前，已在菊花(*Chrysanthemums*)、苹果 (*Malus domestica*)和荔枝 (*Litchi chinensis*)等多种植物中得到分离和鉴定，这些转录因子大都能激活多个类黄酮生物合成关键酶基因的表达(Xiang et al, 2015; Xu et al, 2017; Lai et al, 2016)。

甘薯是世界上广泛种植的粮食和经济作物 (Hu et al, 2016)。作为一种联合国粮食农业组织推荐的健康食品，甘薯富含淀粉、纤维素及多种有益的次生代谢物，如β胡萝卜素和花青素 (Liu et al, 2017)。不同的甘薯品种中，紫肉甘薯富含的花青素，具有较高的食用和药用价值 (Li et al, 2013)。相对于模式植物而言，甘薯花青素生物合成和调控机理研究相对滞后，目前还没有关于bHLH蛋白调控花青素生物合成的相关报道（李霞等, 2014）。在先前的研究中，笔者通过对不同肉色甘薯品种进行了比较转录组学分析，筛选到一批与花青素积累相关的差异表达基因，获得1条与其它植物中GL3高度同源的EST序列。本研究将克隆IbGL3基因，并对其进行生物信息学分析，检测其表达特征与花青素积累的相关性，为进一步

揭示该基因花青素的生物合成中的功能和作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1实验材料

供试的甘薯材料种植于海南农业科学院永发基地。选取种植5个月后生长发育基本一致的白肉、花紫和紫肉甘薯品种的新鲜块根为实验材料用于RNA提取和花青素的测定。

1.2花青素提取和测定

采用1%盐酸溶液作为提取液提取甘薯块根花青素，采用分光光度法测定花青素含量，具体参考刘桂玲等 (2007)的方法。

1.3核酸提取和cDNA的合成

甘薯块根中RNA提取采用天根多糖多酚植物总RNA提取试剂盒；按照Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将将RNA反转录成合成cDNA第一链。

1.4 基因克隆和序列分析

根据转录组数据中注释为GL3的EST序列，设计5′端特异引物PGL3F：5′-GCCCAGTTTGTTCAAGAGCC-3′ 和 5′ 端 引 物 PGL3R ：5′-AGTTAGGGATAAACCTTTGCT-3′， 以甘薯cDNA为模板对*IbGL3*进行扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定，回收目的条带与pMD19-T载体连接并转化大肠杆菌DH5α，通过蓝白斑筛选和菌落PCR鉴定阳性克隆，送诺赛基因公司测序。利用ExPASy在线软件（https://www.expasy.org/）分析预测蛋白的氨基酸组成、分子式、分子量、等电点、稳定性和亲水性等；利用PSORT (http://psort1.hgc.jp/form.html) 预测亚细胞定位；利用SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽分析；利用TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测跨膜结构；利用DNAMAN软件进行氨基酸序列比对分析；利用MEGA7进行进化树分析。

1.5 基因表达分析

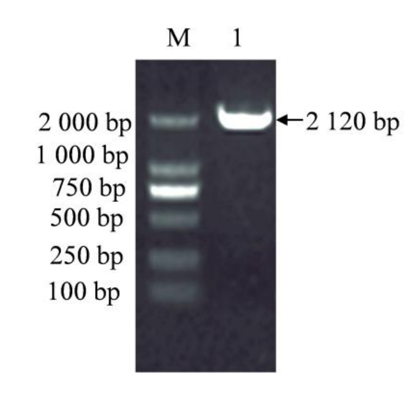
利用SYBR® Select Master Mix试剂盒在Mx3005P Real-Time PCR System上进行qPCR分析。内参基因为*Actin*，引物序列为ACT-F

(5′-CTGGTGTTATGGTTGGGATGG-3′) 和 ACT-R (5′-GGGGTGCCTCGGTAAGAAG-3′)；目的基因引物GE3-F(5′-CATCTGGACTGCGAAACTATCC-3′) 和 GE3-R (5′-GCTGGTGATGGTGACGTTAAT -3′)。qPCR反应体积20 μL：10 μL 2×SYBR mix，正反向引物各1 μL (10 μmol·L^{-1})，1 μL cDNA模板，7 μL ddH_2O。 qPCR反应条件：95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，40个循环。

2 结果与分析

2.1 *IbGL3*的克隆

根据在甘薯转录组数据中获得的*IbGL3*基因的EST序列，设计特异引物对该基因的全长序列进行扩增，获得一条2 100 bp左右的特异条带 (图1)。将目的片段连接到T载体上进行测序，测序结果与通过转录组测序得到结果一致，将该基因命名为*IbGL3*。本研究获得的*IbGL3*基因全长2 120 bp，包含一个1 878 bp完整的开放阅读框。



注：**M**. DL 2000 Marker；**1**. PCR扩增产物。

Note: **M**. DL 2000 Marker; **1**. PCR product.

图1 *IbGL3*的扩增电泳图

Fig.1 Electrophoretic result of *IbGL3* PCR product

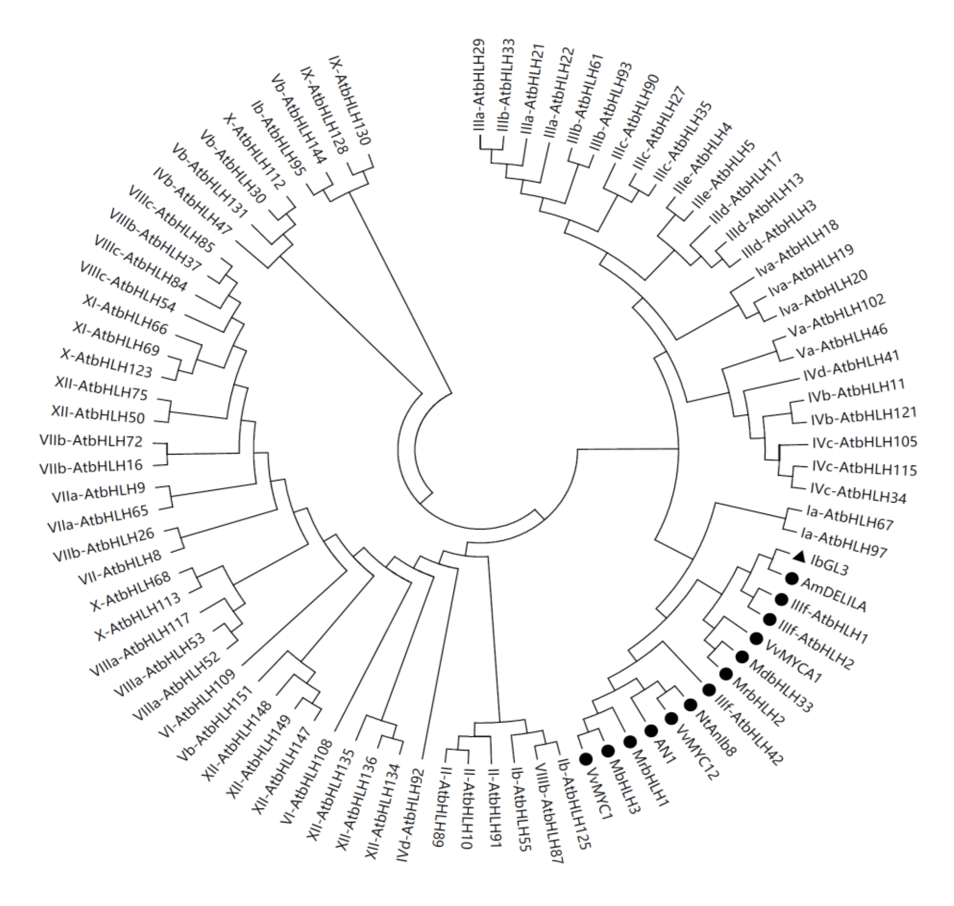
2.2 IbGL3的分子特征

IbGL3 编码蛋白由 625 个氨基酸组成，其中丝氨酸（Ser）最多，有 63 个，占比达到 10.1%。IbGL3 蛋白分子式为 $C_{2982}H_{4784}N_{854}O_{982}S_{24}$, 预测分子量为 69.08 kD，理论等电点 5.20，不稳定系数为 43.06，被归类为不稳定蛋白；总平均疏水指数为-0.555 属于亲水性蛋白。亚细胞定位预测显示 IbGL3 定位在细胞核内的可

能性最大，核定位信号(PSSKKRKASKT)位于 C-端。信号肽分析显示 IbGL3 蛋白没有信号肽，不属于分泌蛋白。跨膜结构域分析显示 IbGL3 蛋白无跨膜结构域。

2.3 IbGL3的进化和同源性分析

为了进一步了解IbGL3的功能和进化特征，将IbGL3氨基酸序列与拟南芥不同亚类的bHLH蛋白及其他植物中已鉴定的与花青素合成相关的bHLH蛋白一起聚类分析，结果显示IbGL3与TT8、GL3和EGL3聚在一起，属于IIIf 亚类成员 (图2)。目前，在不同植物中鉴定的调控花青素生物合成的bHLH蛋白大都属于IIIf 亚类，这说明IbGL3可能具有调控甘薯花青素生物合成的功能。将IbGL3和其他调控花青素的bHLH蛋白进行序列比对，发现这些蛋白都包含3个保守的结构域：N端与MYB蛋白互作的MIR区、bHLH结构域和位于C端的ACT类似结构域 (图3)。

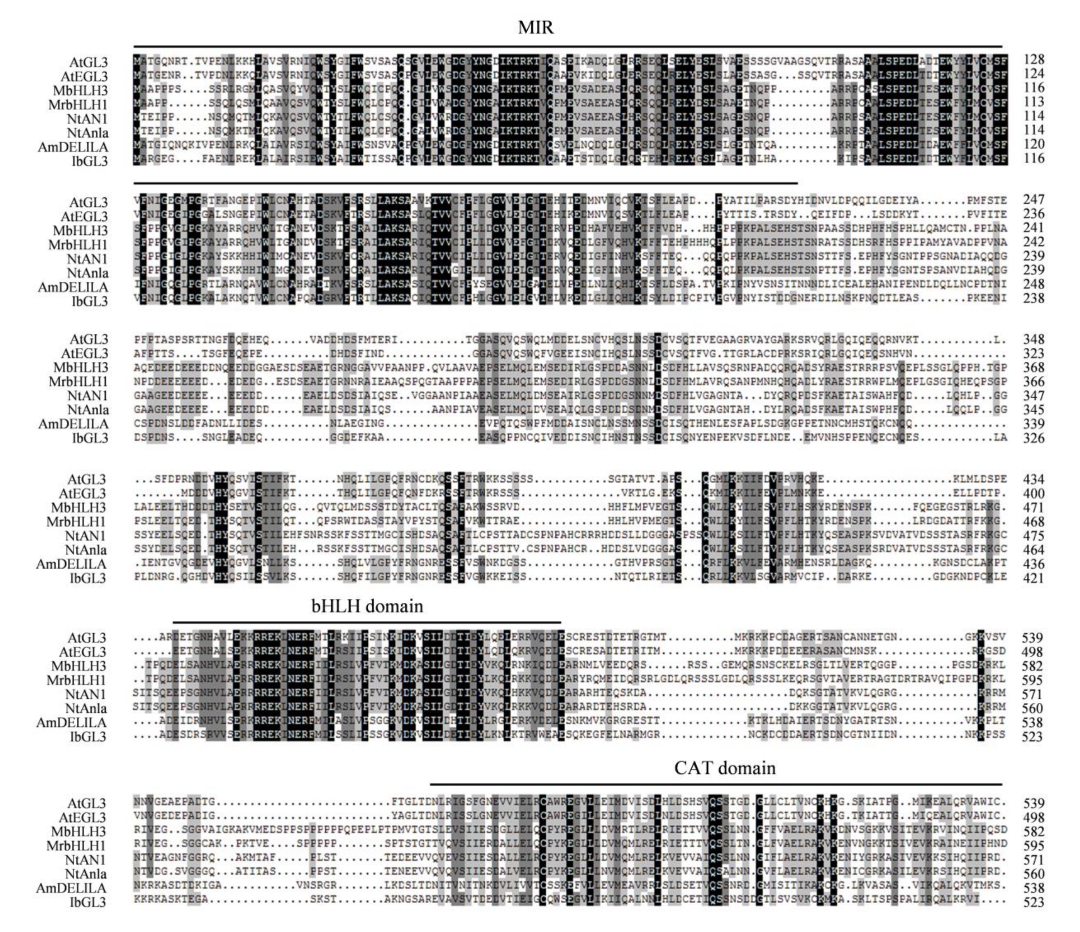


注：三角形标示IbGL3；圆形标示其他植物花青素合成相关的bHLHs。

Note: IbGL3 is marked with triangle; bHLHs involved in anthocyanin biosynthesis are marked with black dots.

图2 IbGL3的进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of IbGL3



注：划线处为保守的结构域MIR区、bHLH结构域和CAT结构域。

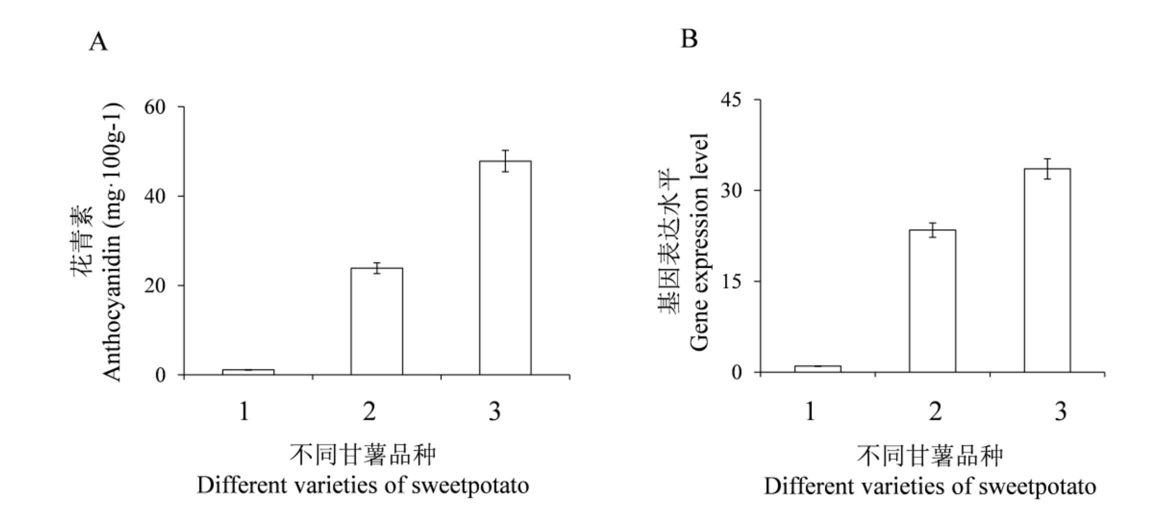
Note: Conserved MIR domain, bHLH domain and CAT domain are underlined.

图3 IbGL3和其他植物花青素相关的bHLHs的序列比对

Fig.3 Alignment of IbGL3 and anthocyanin-related bHLHs form other plants

2.4 *IbGL3*表达与花青素积累的相关性分析

为了分析*IbGL3*表达与花青素积累的相关性，利用定量PCR技术检测了*IbGL3*在不同肉色甘薯块根中的表达特征，发现*IbGL3*在紫色甘薯中的表达量最高，在浅紫甘薯中的表达量次之，而在白肉甘薯中表达量最低，与甘薯花青素含量正相关（图4)。



注：**A**. 不同品种甘薯花青素含量；**B**. 不同品种甘薯*IbGL3*表达量；

1、**2**和**3**分别代表白色、浅紫和紫色甘薯。

Note: **A**. Content of anthocyanin in the storage root of different sweet potato varieties; **B**. The expression of *IbGL3* in the storage root of different sweet potato varieties; **1**, **2** and **3** represent respectively white-, light purple- and purple- fleshed sweet potato.

图4 *IbGL3*的表达与花青素积累的相关性

Fig.4 Correlation between *IbGL3* expression and anthocyanin accumulation

3 讨论与结论

bHLH 转录因子是一类真核生物中存在最广泛的一大类转录因子，在植物细胞大小和命运调控、激素响应、金属体内平衡、光形态发生和花器官发育等多种生理过程中具有重要的调控作用(Heim et al, 2003; Feller et al, 2011; Yang et al, 2017)。调节花青素生物合成的bHLH转录因子大都属于IIIf 亚类，通过改变或过表达花青素合成相关*bHLH*基因能够影响植物体内花青素的积累（Xu et al, 2015；Li et al, 2016; Lim et al, 2017）。本研究在甘薯中克隆一个编码bHLH与拟南芥GL3同源的基因*IbGL3*，其编码区全长为1 878 bp，编码625个氨基酸。亚细胞定位预测显示IbGL3 蛋白定位在细胞核内，说明IbGL3在细胞核内发挥功能。进化分析显示IbGL3属于IIIf亚族的bHLH转录因子，与其他植物中花青素合成相关的bHLH蛋白具有较高的同源性，都含有保守的MIR区、bHLH结构域和ACT结构域。bHLH 转录因子通常与MYB转录因子相互作用协同调控花青素的生物合成，MIR区是bHLH与MYB蛋白互作区位于bHLH的N端（Heim et al, 2003; Feller et al, 2011)。bHLH结构域是DNA结合结构域，能形成同源或异源二聚体，这是bHLH蛋白与DNA结合的前提（Heim et al, 2003; Feller et al, 2011)。

ACT类似结构域位于C端，是一段富含酸性氨基酸的序列，该区域能够与RNA聚合酶II结合并启动转录；此外，该区域也与bHLH二聚体的形成有关(Feller et al, 2006)。功能预测分析表明IbGL3可能具有调控甘薯花青素生物合成中的功能。表达分析显示*IbGL3*在紫肉甘薯中大量表达，在浅紫色甘薯中的表达量次之，而在白肉甘薯中表达量最低，与花青素积累正相关，进一步说明*IbGL3*可能是甘薯花青素生物合成的调控基因。下一步将进一步研究*IbGL3*在花青素生物合成中的生物学功能和调控机理，为甘薯花青素生物合成遗传改良奠定基础。

参考文献:

ALBERT NW, DVIES KM, LEWIS DH, et al, 2014. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in Eudicots [J]. Plant Cell, 26(3): 962–980.

CHNDLER VL, RADICELLA JP, ROBBINS TP, et al, 1989. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences [J]. Plant Cell, 1(12): 1175–1183.

FELLER A, HERMANDEZ JM, GROTEWOLD E, 2006. An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helixloop-helix transcription factors [J]. J Biol Chem, 281(39): 28964–28974.

FELLER A, MACHEMER K, BRAUN EL, et al, 2011. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. Plant J, 66(1): 94–116.

GONZALEZ A, ZHAO M, LEAVITT JM, et al, 2008. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedling [J]. Plant J, 53(5): 814–827.

HEIM MA, JAKOBY M, WERBER M, et al, 2003. The basic Helix-Loop Helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. Mol Biol Evol, 20(5): 735–747.

HICHRI I, BARRIEU F, BOGS J, et al, 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. J Exp Bot, 62(8): 2465.

HU YJ, DENG LQ, CHEN JW, et al, 2016. An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars [J]. Food Chem, 194: 46–54.

LAI B, DU LN, LIU R, et al, 2016. Two LcbHLH transcription factors interacting with LcMYB1 in regulating late structural genes of anthocyanin biosynthesis in *Nicotiana* and *Litchi chinensis* during anthocyanin accumulation [J]. Front Plant Sci, 7(212): 166.

LILA MA, 2008. Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach [J]. J Biomed Biotechnol, (5): 306–313.

LI J, LI XD, ZHANG Y, et al, 2013. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in

aqueous solutions with various pH values and fruit juices [J]. Food Chem, 136(3–4): 1429–1434.

LIM SH, KIM DH, KIM JK, et al, 2017. A Radish Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, RsTT8 Acts a Positive Regulator for Anthocyanin Biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 8: 1917.

LI X, WANG X, LIU YJ, et al, 2014. Progress on anthocyanin biosynthesis of sweet potato [J]. Mol Plant Breeding, 12(3): 567–576. [李霞，王欣，刘亚菊，等, 2014.甘薯花青苷生物合成调控研究进展 [J]. 分子植物育种, 12(3): 567–576.]

LI Y, SHAN X, GAO R, et al, 2016. Two IIIf clade-bHLHs from *Freesia hybrida* play divergent roles in flavonoid biosynthesis and trichome formation when ectopically expressed in *Arabidopsis* [J]. Sci Rep, 6: 30514.

LIU G L, LI H X, GUO B H, et al, 2007. Effects of different extraction methods on anthocyanin content detection in sweet potato[J]. Chin Agric Sci Bull, 23(4): 91–94.[刘桂玲，李海霞，郭宾会,等. 2007.不同提取方法对甘薯花青素含量测定的影响 [J]. 中国农学通报, 23(4): 91–94.]

LIU X, XIANG M, FAN Y, et al, 2017. A root-preferential DFR-like gene encoding dihydrokaempferol reductase involved in anthocyanin biosynthesis of purple-fleshed sweet potato [J]. Front Plant Sci, 8(8227): 279.

PANCHE AN, DIWAN AD, CHANDRA SR, 2016, Flavonoids: An overview [J]. J Nutr Sci, 5: e47.

WANG H, LI MF, YANG Y, et al, 2015. Recent advances on the molecular mechanisms of anthocyanin synthesis in fruits [J]. Plant Physiol J, 51(1): 29–43.

XIANG LL, LIU XF, LI X, et al, 2015. A novel bHLH transcription factor involved in regulating anthocyanin biosynthesis in Chrysanthemums (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) [J]. PLoS ONE, 10(11): e0143892.

XU H, WANG N, LIU J, et al, 2017. The molecular mechanism underlying anthocyanin metabolism in apple using the *MdMYB16* and *MdbHLH33* genes [J]. Plant Mol Bio, 2017, 94(1-2): 149–165.

XU W, DUBOS C, LEPINIEC L, et al, 2015. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes [J]. Trends Plant Sci, 20(3): 176–185.

YANG J, GAO M, HUANG L, et al, 2017. Identification and expression analysis of the apple (*Malus×domestica*) basic helix-loop-helix transcription factor family [J]. Sci Rep, 7(1): 28.

SEN L, SU YJ, ZHANG B, et al, 2010. Adaptive evolution of the *rbcL* gene in pteridaceous ferns [J]. J Trop Subtrop Bot, 18(1): 1–8. [森林，苏应娟，张冰，等, 2010. 凤尾蕨科植物 *rbcL* 基因的适应性进化分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 18(1): 1–8.]

SUN YL, LI QM, YANG JY, et al, 2005. Morphological variation in cones and seeds in *Abies chensiensis* [J]. Acta Ecol Sin, 25(1): 176-181. [孙玉玲, 李庆梅，杨敬元，等, 2005. 秦岭冷杉球果与种子的形态变异 [J]. 生态学报, 25(1): 176–181.]